

# Kennedy Syndrom: Maus-Modelle und Mechanistische Studien

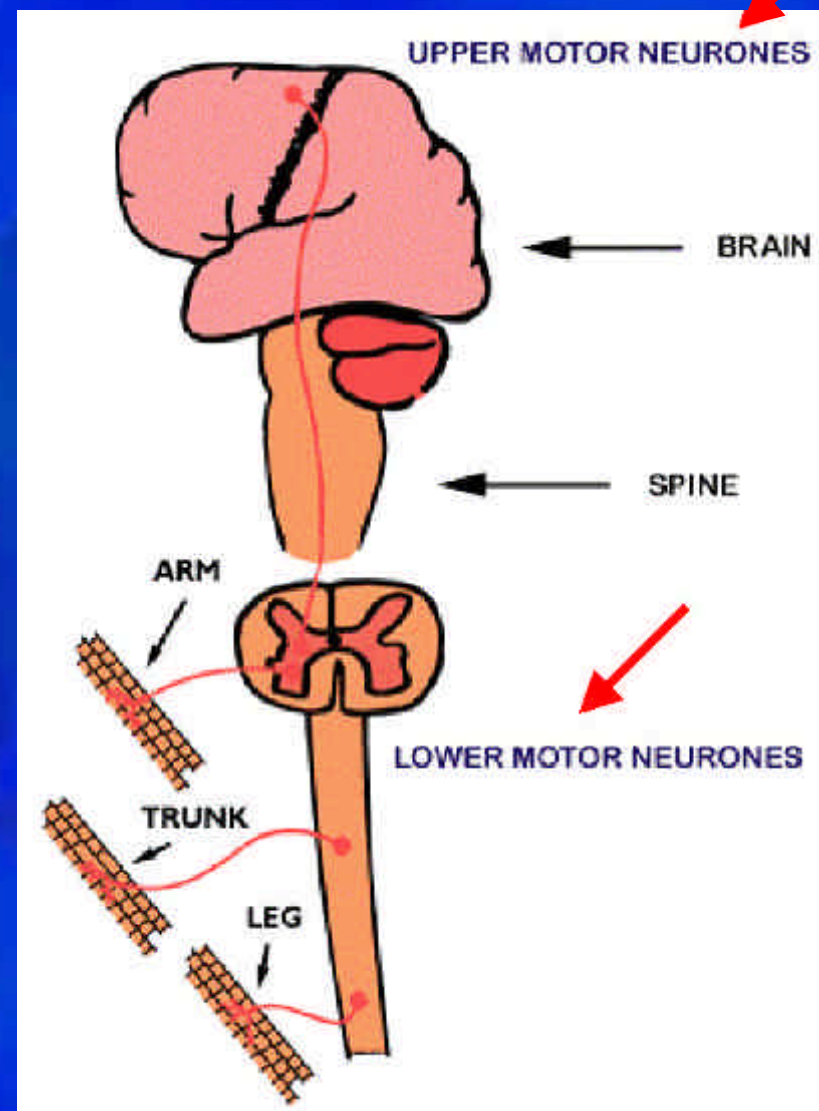
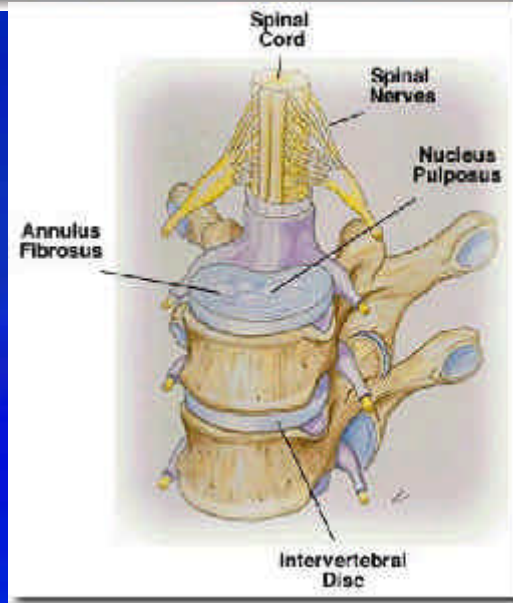
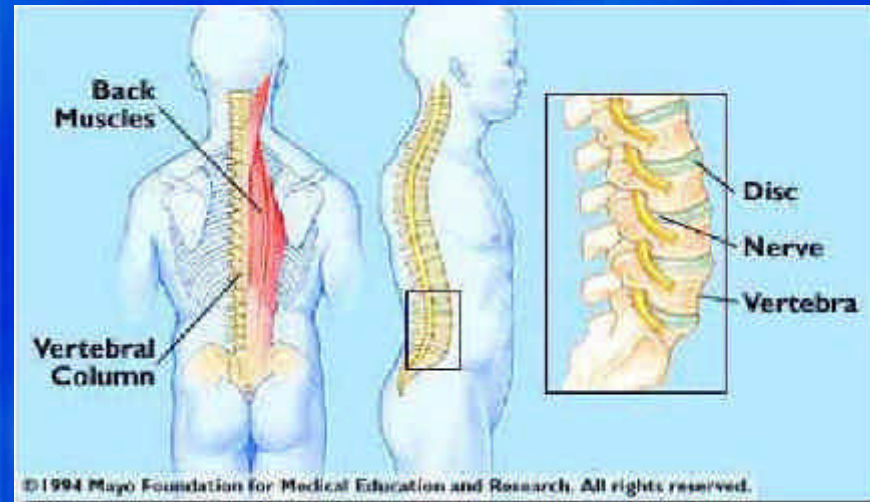


## Kennedy Syndrom - SBMA

- **Kennedy Syndrom – Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA)**
- **Mausmodelle der SBMA**
- **Transkriptionale Regulationsstörung - Motoneuronverlust**
- **Rolle des Testosterons bei SMBA**
- **Eiweißabbau und transkriptionale Regulationsstörung**

Kennedy Syndrom:  
Was für eine Art Krankheit  
ist das?

# Motoneuron-Erkrankung

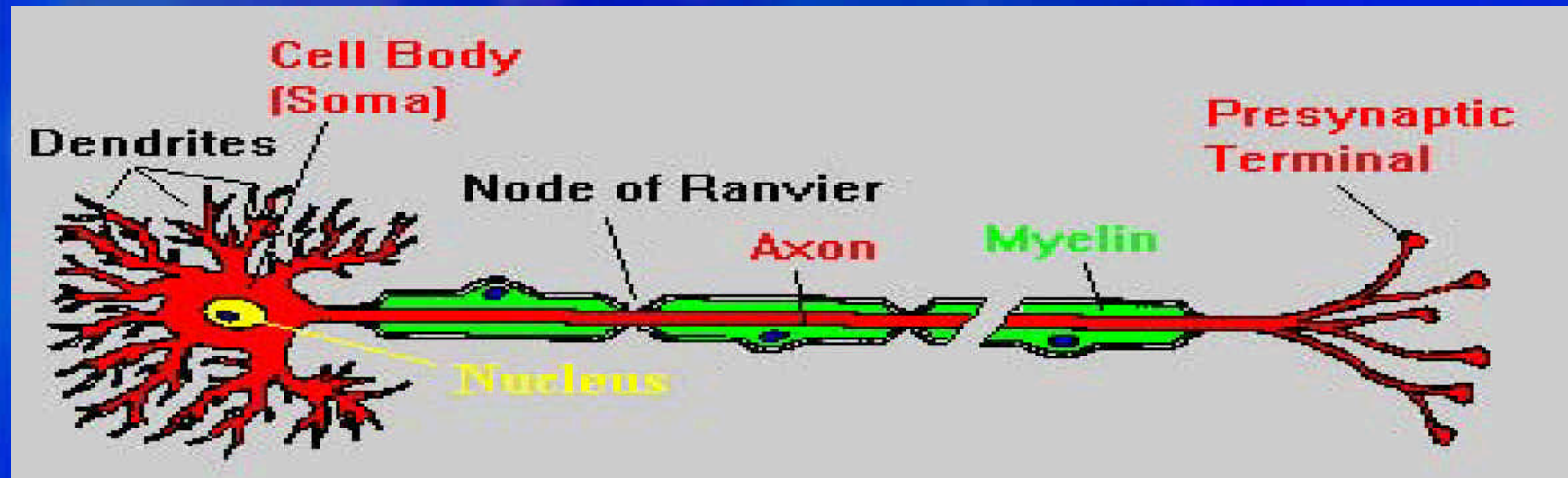


## Motoneuron-Erkrankungen

- **Amyotrophe Lateralsklerose oder Lou Gehrig's Krankheit** schädigt sowohl die oberen als auch unteren Motoneuronen – Genetische und Umweltfaktoren
- **Polio** betrifft die unteren Motoneuronen und wird ausgelöst durch den Polio-Virus
- **Spinale Muskelatrophie (SMA)** schädigt die oberen Motoneuronen – eine, die in mehreren Symptomen der Lou Gehrig's Krankheit ähnelt ist das **Kennedy-Syndrom** oder die **X-linked Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA)**
- **Die Wahrscheinlichkeit ist 1 zu 50.000 oder anders ausgedrückt erhalten 5.500 Patienten in den USA pro Jahr die Diagnose Motoneuron-Erkrankung**



## Bewegung geschieht durch die Aktion der Motoneuronen

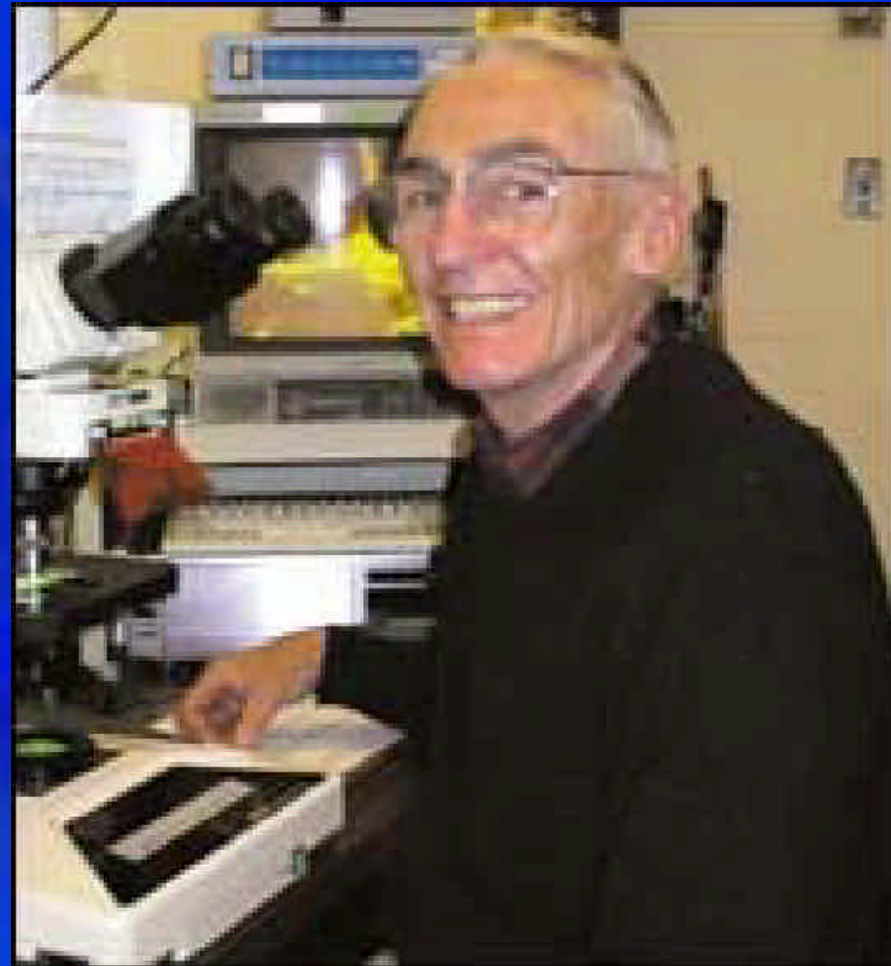


Die Anatomie der Motoneuronen ist ganz besonders:  
Das sehr lange Axon erreicht 10.000 mal die Länge seines Zellkörpers

Wie wurde das  
Kennedy-Syndrom  
entdeckt?

## Entdeckung Kennedy-Syndrom

- **William R. Kennedy**
  - Neurologe an der Universität von Minnesota
- **1964 wurde George B. an Kennedy verwiesen**
  - mit Verdacht auf ALS
- **Bei ALS tritt Verlust der oberen und unteren Motoneuronen auf**
  - George hatte nur Symptome, die auf den Verlust der oberen Neuronen hinwiesen
- **Fortschreitende Schwäche und Zucken der Muskeln**





# Symptome beim Kennedy-Syndrom

## **EFFEKTE DER MOTONEURON-DEGENERATION**

- Muskelschwäche und –verlust
- Schluckbeschwerden – bulbäre Muskeln/Hirnstamm
- Sprachfehlfunktion
- Wackelige Muskeln
- Muskelzittern
- Fehlende Reflexe

## **EFFEKTE DER FEHLREGULIERUNG DER MÄNNL. HORMONE**

- Vergrößerte Brust
- Geringe Anzahl von Spermien
- Geschrumpfte Hoden

Welche genetische Mutation  
löst das Kennedy-Syndrom  
aus?

# Kennedy-Syndrom

Poly-Q-Einfügung

1



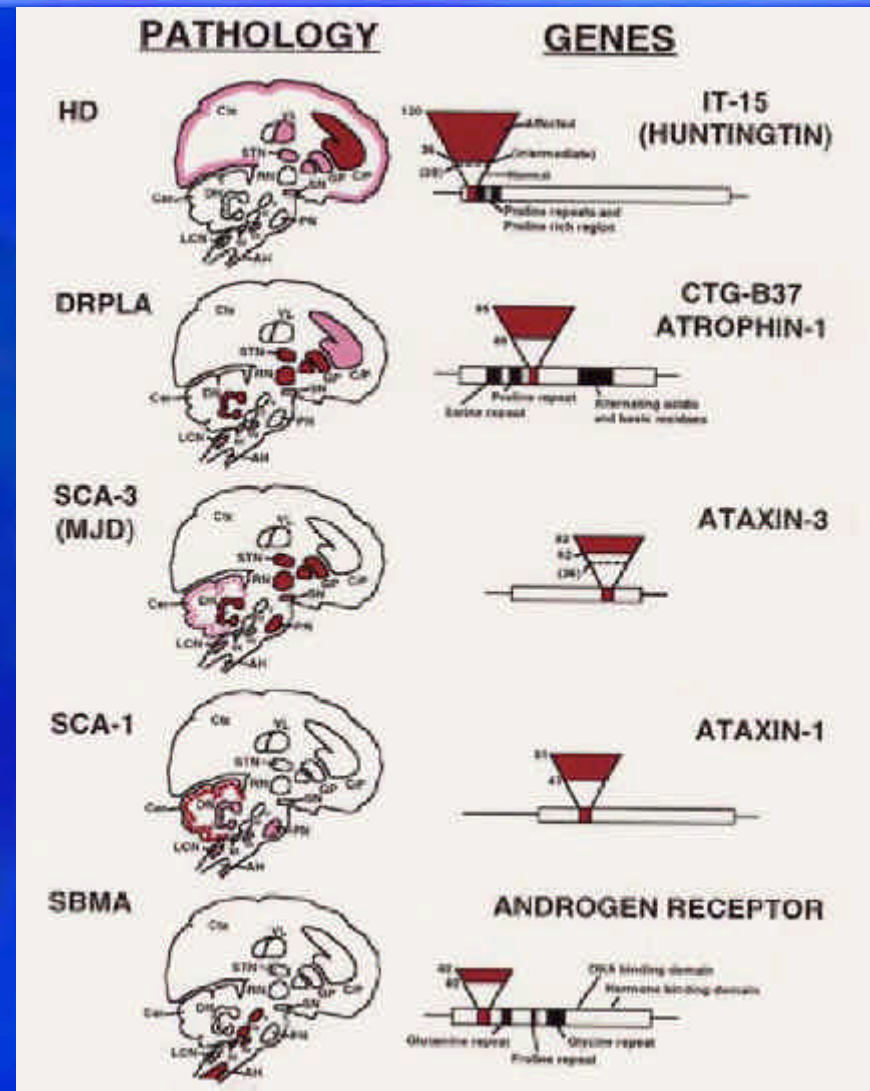
900

Androgen Receptor

- **SBMA wird verursacht durch eine Poly-Q-Verlängerung (CAG-Verlängerung am N-Ende des Androgenrezeptors).**
- **Erweiterungen auf über 36 – 38 CAG-Wiederholungen lösen SBMA aus.**
- **Höhere Verlängerungen führen zu einem früheren Ausbruch der Krankheit**

Al La Spada and Kenneth Fischbeck, 1991

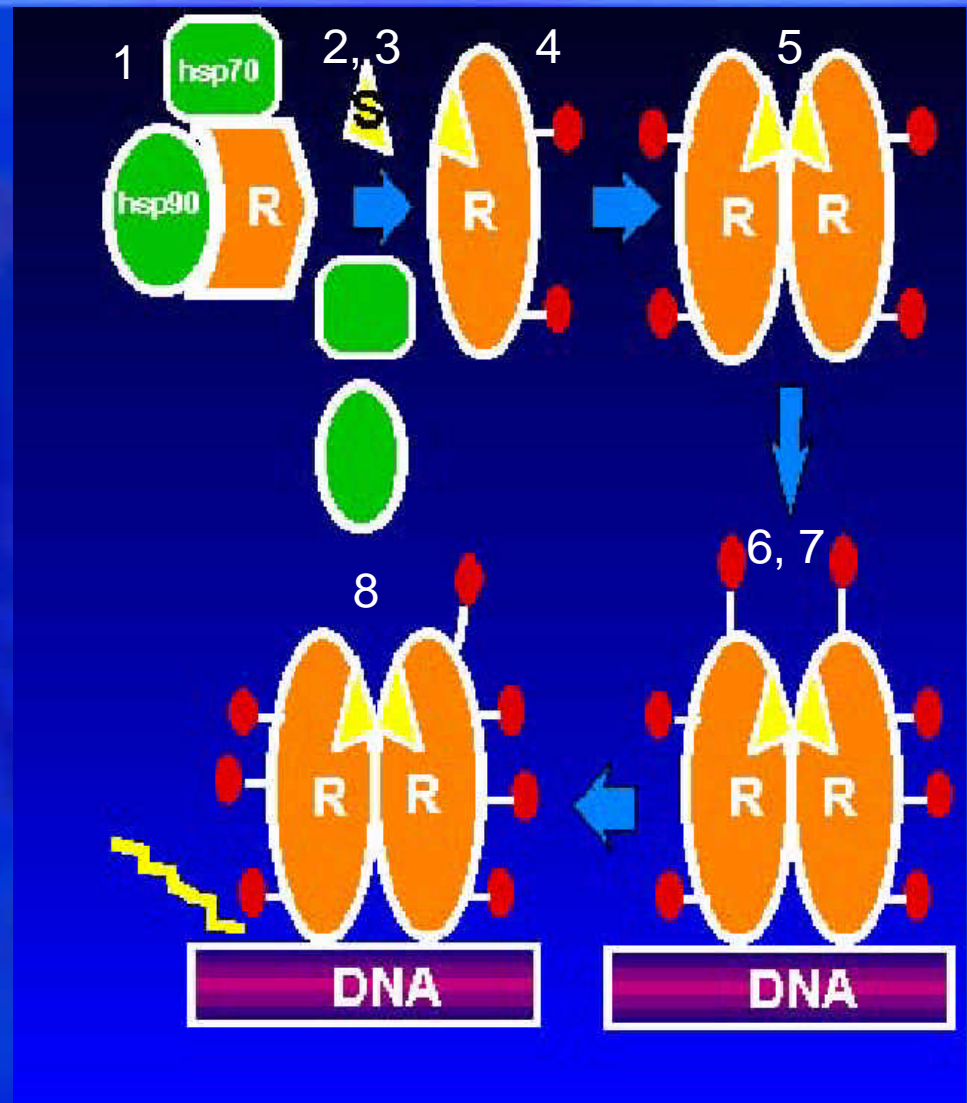
- **Mindestens 8 sind inzwischen bekannt (HD, DRPLA, SCA-1, 2, 3, 7, 17 und SBMA)**
- **DRPLA ist überwiegend wie HD.**
- **Betroffene Gehirnregionen einschließlich Hirnrinde, Basalganglien, Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark (Vorderhorn)**
- **Die Gene vereint keine Homologie außer der Poly-Q-Wiederholungen**
- **Der Androgenrezeptor ist ein DNA-anbindender Transkriptionsfaktor**





# Androgenrezeptor-Aktion

- (1) Steroid bindet an Rezeptor
- (2) Löst Hitzeschock-Proteine
- (3) Konformativer Übergang
- (4) Phosphorylierung
- (5) Dimerisierung
- (6) Bindung an die DNA
- (7) Weitere Phosphorylierung
- (8) Aktivierung der Transkription



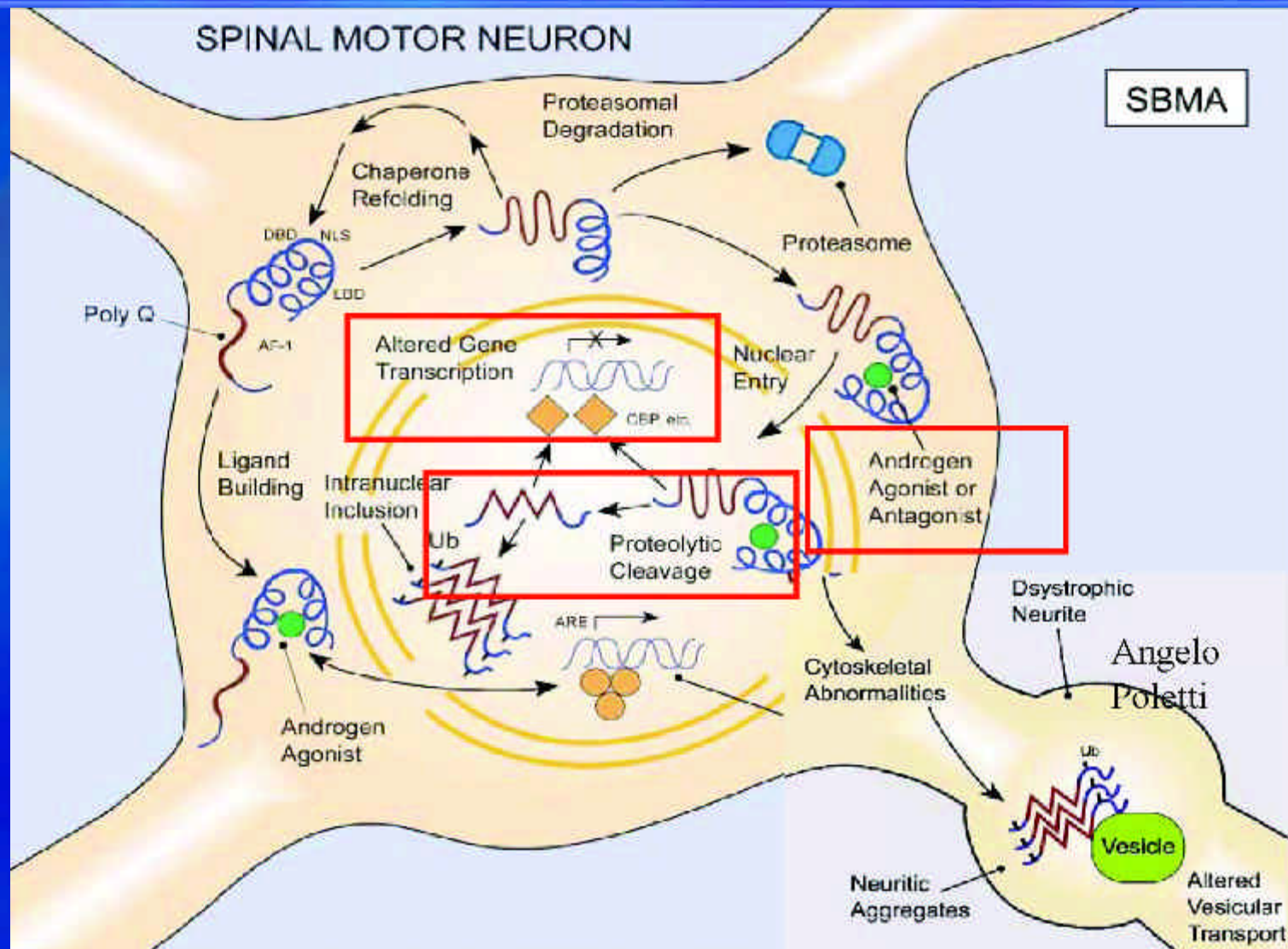


## Kennedy-Syndrom – Funktionsgewinn

- **Funktionsverlust**  
Mutationen im AR bei Patienten verursacht Verweiblichng aber keinen Verlust von Motoneuronen.
- **Die Erweiterung der Polyglutamin-Repeats hat keinen Einfluss auf die Hormonbindung und verringert die Fähigkeit, Gene zu transaktivieren, nur wenig**
- **Teilweiser Funktionsverlust – Gynäkomastie vorrangig Funktionsgewinn**

Was ist der Mechanismus  
von  
Motoneuron-Fehlfunktion  
und –Verlust?

# Ross Neuron 2002



- **Kennedy Syndrom – Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA)**
- **Mausmodelle der SBMA**
- **Transkriptionale Regulationsstörung - Motoneuronverlust**
- **Rolle des Testosterons bei SMBA**
- **Eiweißabbau und transkriptionale Regulationsstörung**

Erzeugung eines SBMA  
Mausmodells das  
Krankheits-Phenotypen  
nachbildet



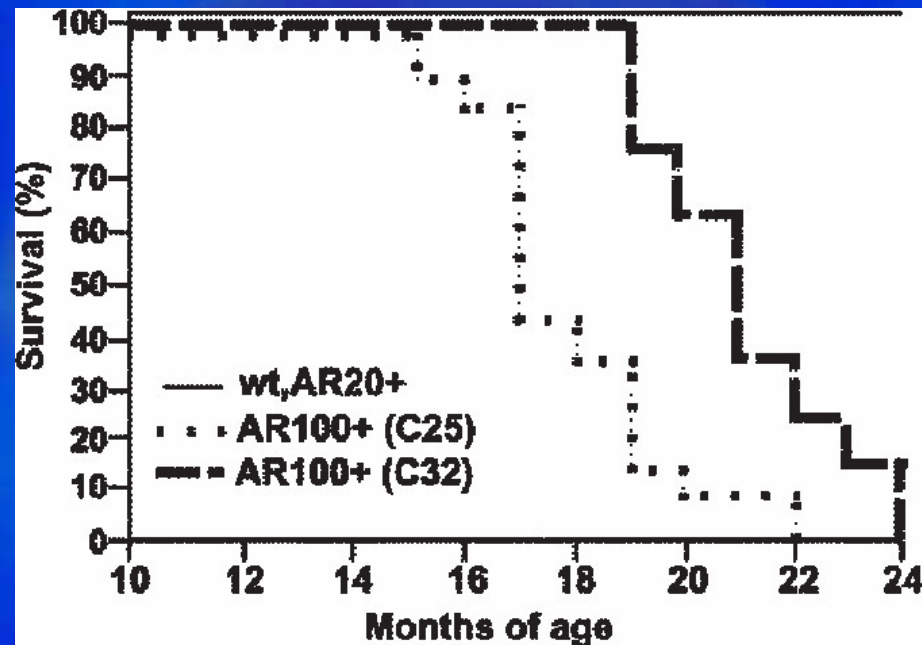


## SBMA-Mausmodell, das die Krankheit nachbildet





## SBMA-Mausmodell, das die Krankheit nachbildet

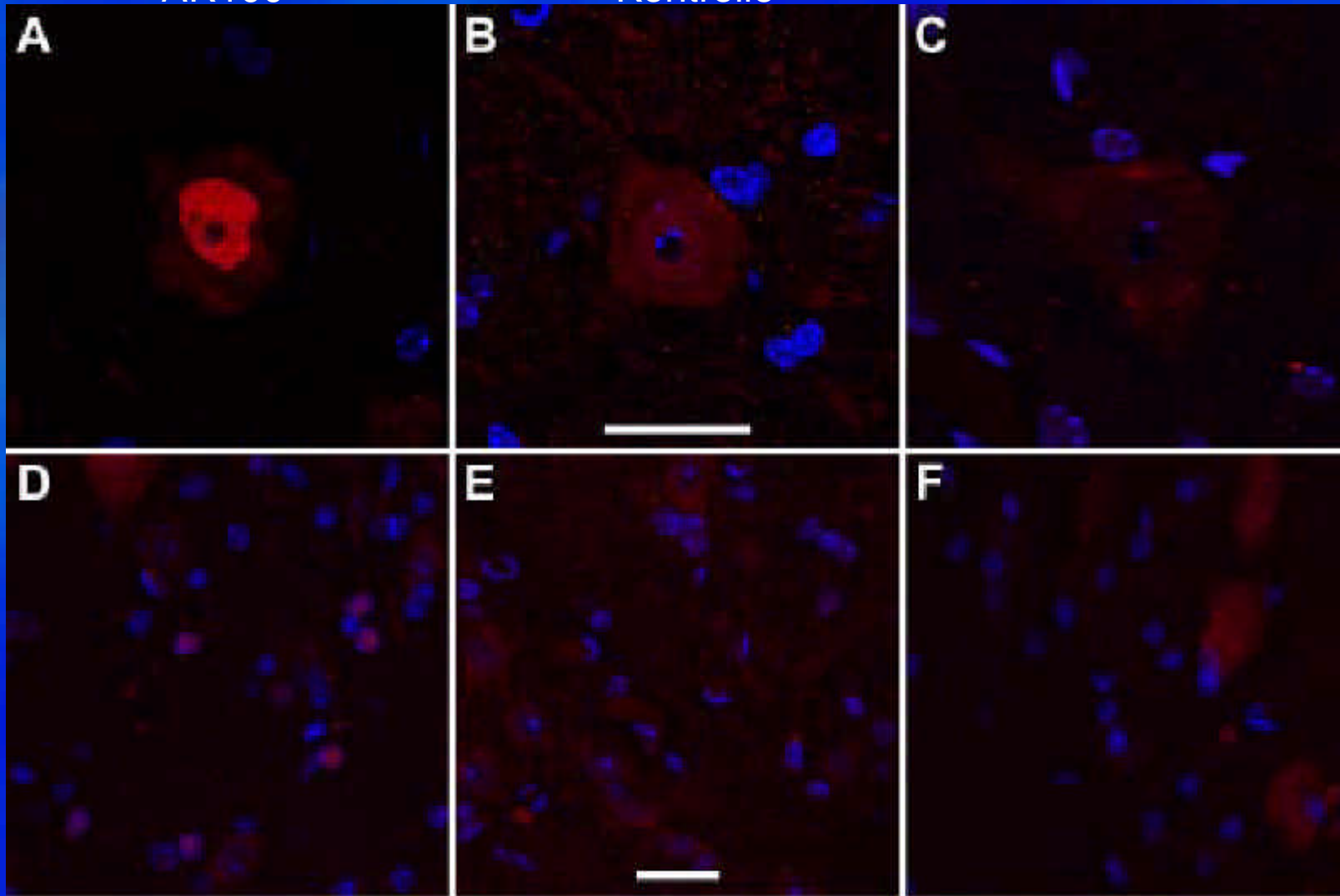


10 Monate alt

# SBMA-Mausmodell: AR100 im Zellkern

AR100

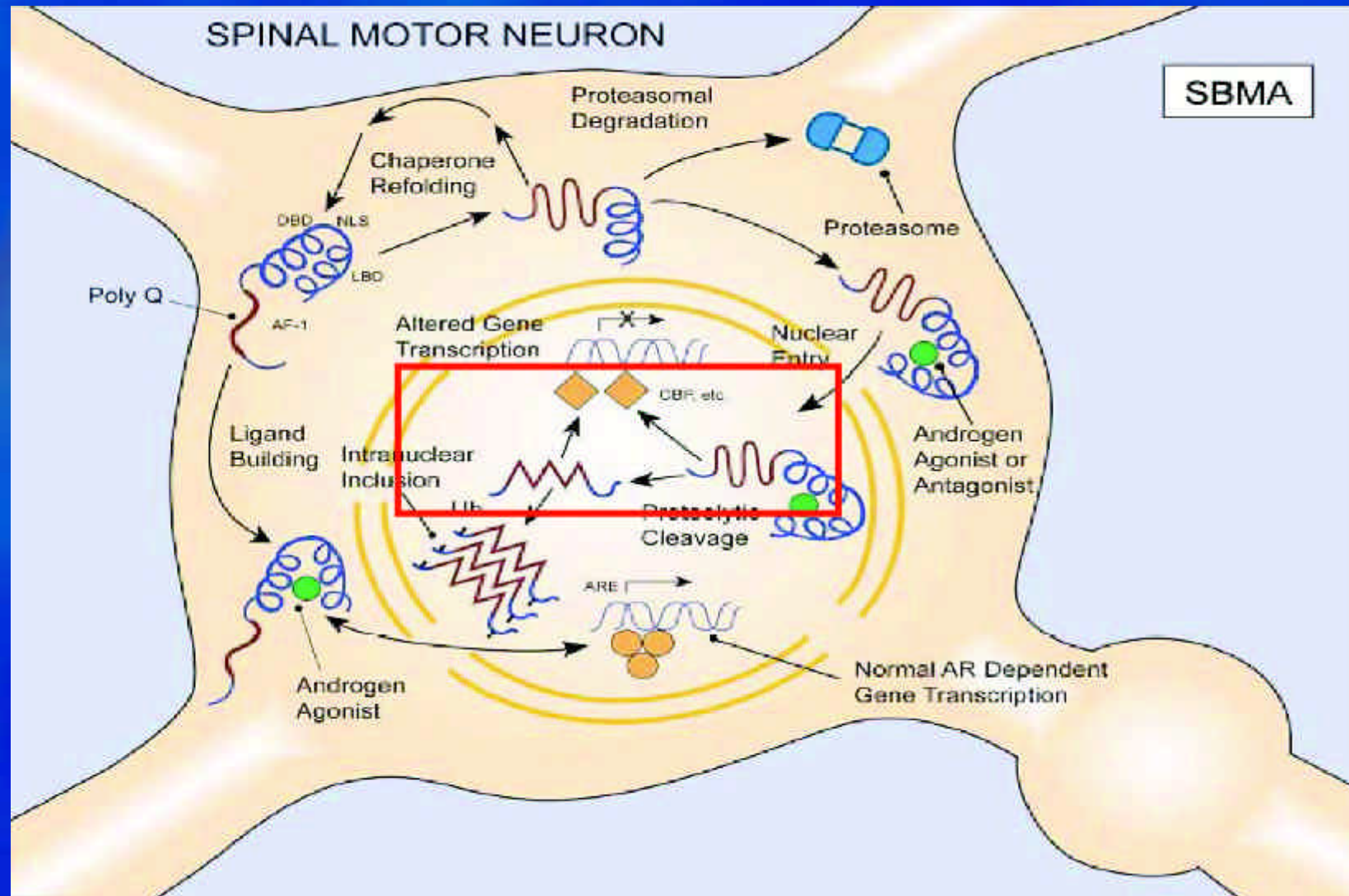
Kontrolle



- **Kennedy Syndrom – Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA)**
- **Mausmodelle der SBMA**
- **Transkriptionale Regulationsstörung - Motoneuronverlust**
- **Rolle des Testosterons bei SMBA**
- **Eiweißabbau und transkriptionale Regulationsstörung**



# Transkriptionale Fehlregulierung - SBMA Nerventoxizität





## Transkriptionsstudien bei Poly-Q-Krankheitsmodellen

**Steffan...Thompson:** CBP und p53-Fliegen Modelle

**Paulson:** CBP

**McCambell...Fischbeck:** CBP

**Wytenbach...Rubinsztein:** CBP

**Nucifora...Ross:** CBP/CREB-HD und DRPLA Tg

**Shimohata...Tsuji:** TAF 130

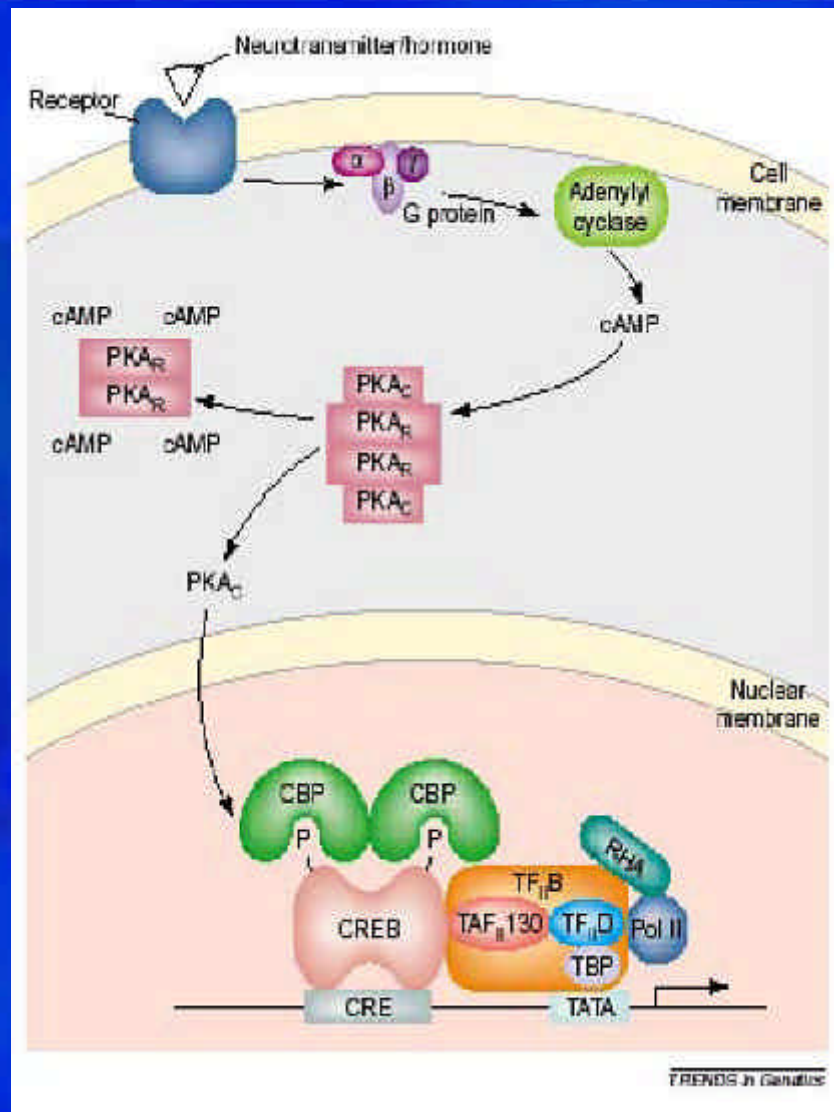
**Li:** Sp1

**Dunah...Krainc:** TAF 130 und Sp1 - über lösbare Interaktionen?

**Anm.: CBP = Creb Binding Protein (Transkriptionsregulator)**

# CBP und Neuronale Signalisierung

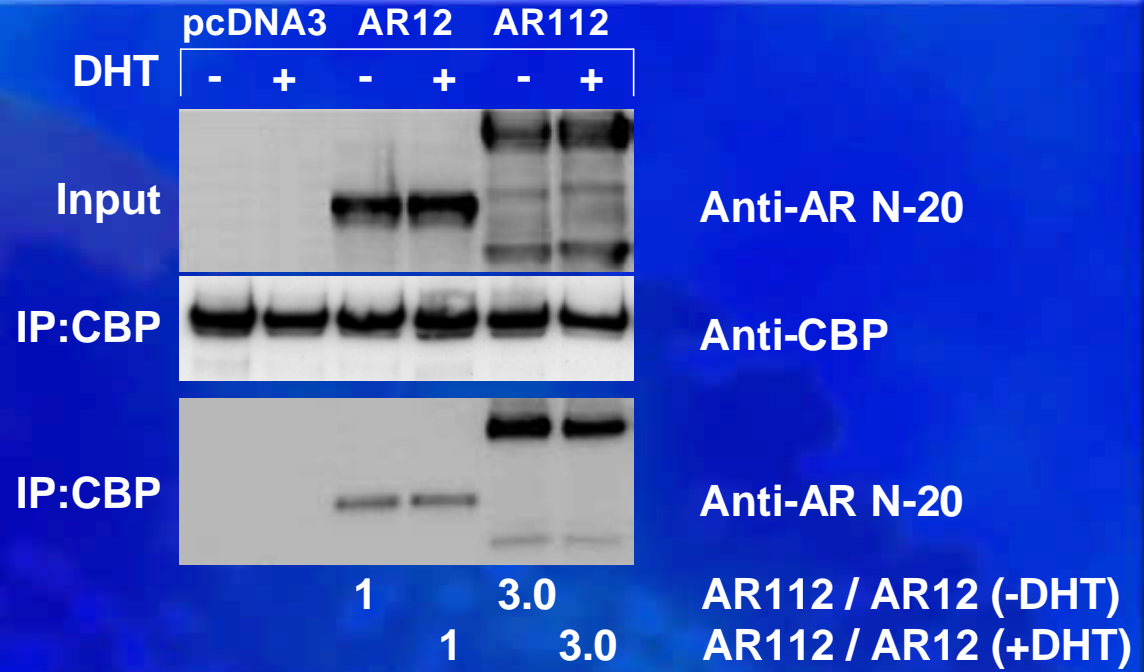
- CBP wird aktiviert durch das von der Zelloberfläche des cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat) abhängige Signalisieren
- Andere signalisierende Nervenbahnen konvergieren auch mit CBP
- CBP aktiviert Gene-Transkription, teilweise durch HAT-Aktivität (Histone Acetyl Transferase)
- CBP-vermittelte Transkription ist wichtiges nervliches Überleben
- CBP ist einbezogen in die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors bekannt als „hypoxia induced transcription factor“ (HIF1- $\alpha$ )-Motoneuronen



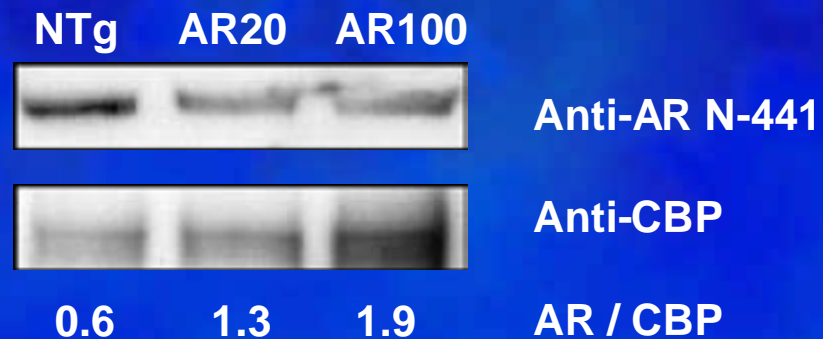


# AR-PolyQ-abhängige Bindung von CBP

## Motoneuron Zellkulturmodell

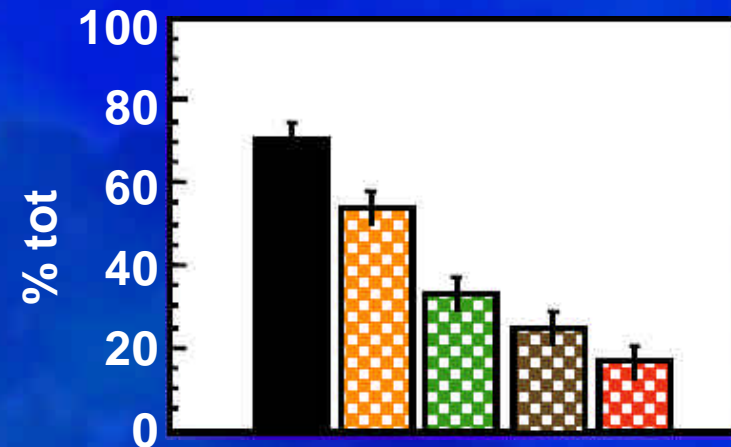
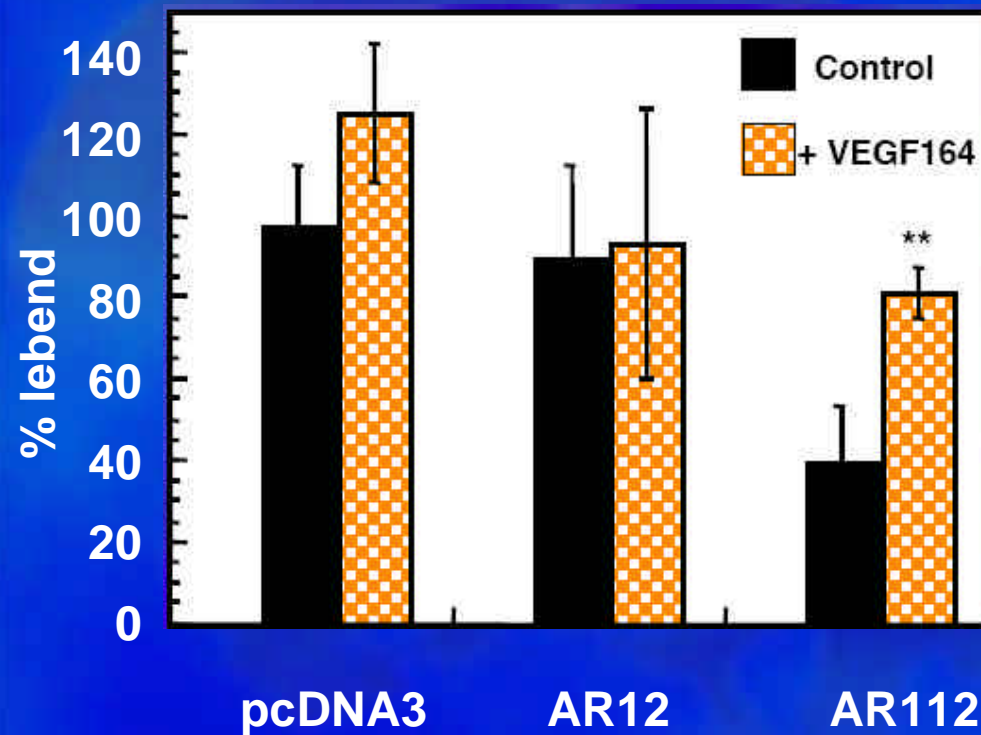






## YAC SMBA Modell





# VEGF\* schützt mutierten Androgenrezeptor vor Nerventod

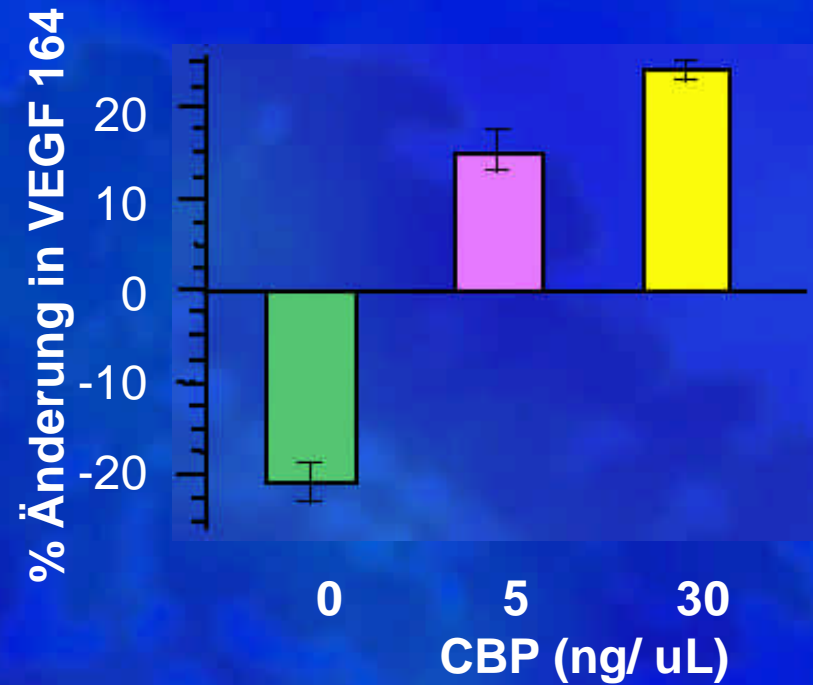
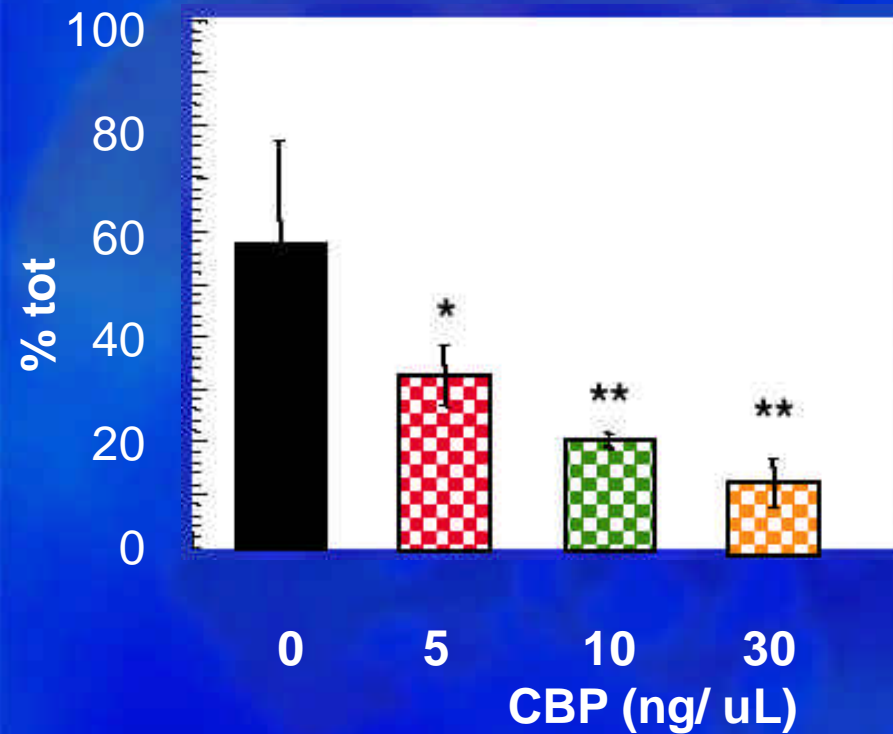


-  AR112 - unbehandelt
-  2.5 ng/ uL VEGF164
-  5.0 ng/ uL VEGF164
-  10 ng/ uL VEGF164
-  20 ng/ uL VEGF164

\*VEGF = vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor



## CBP stellt VEGF 164 Spiegel wieder her, deutet eine kritische Rolle an



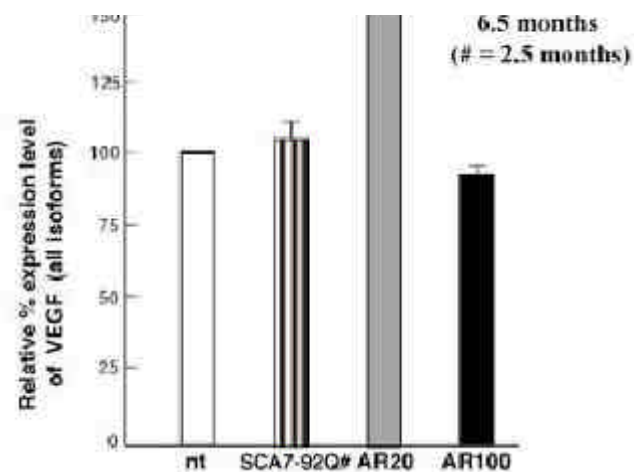
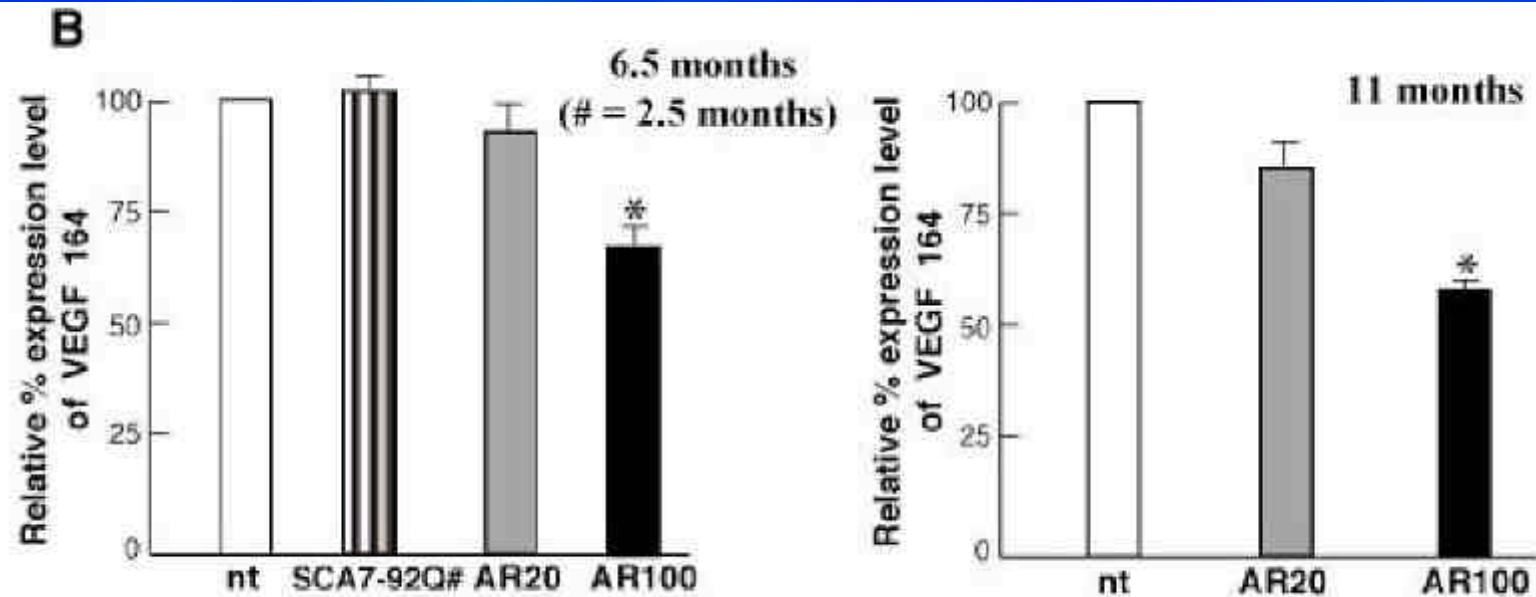
CBP rettet mutierten Androgenrezeptor vor Nerventod

## VEGF und Motoneuron-Überleben

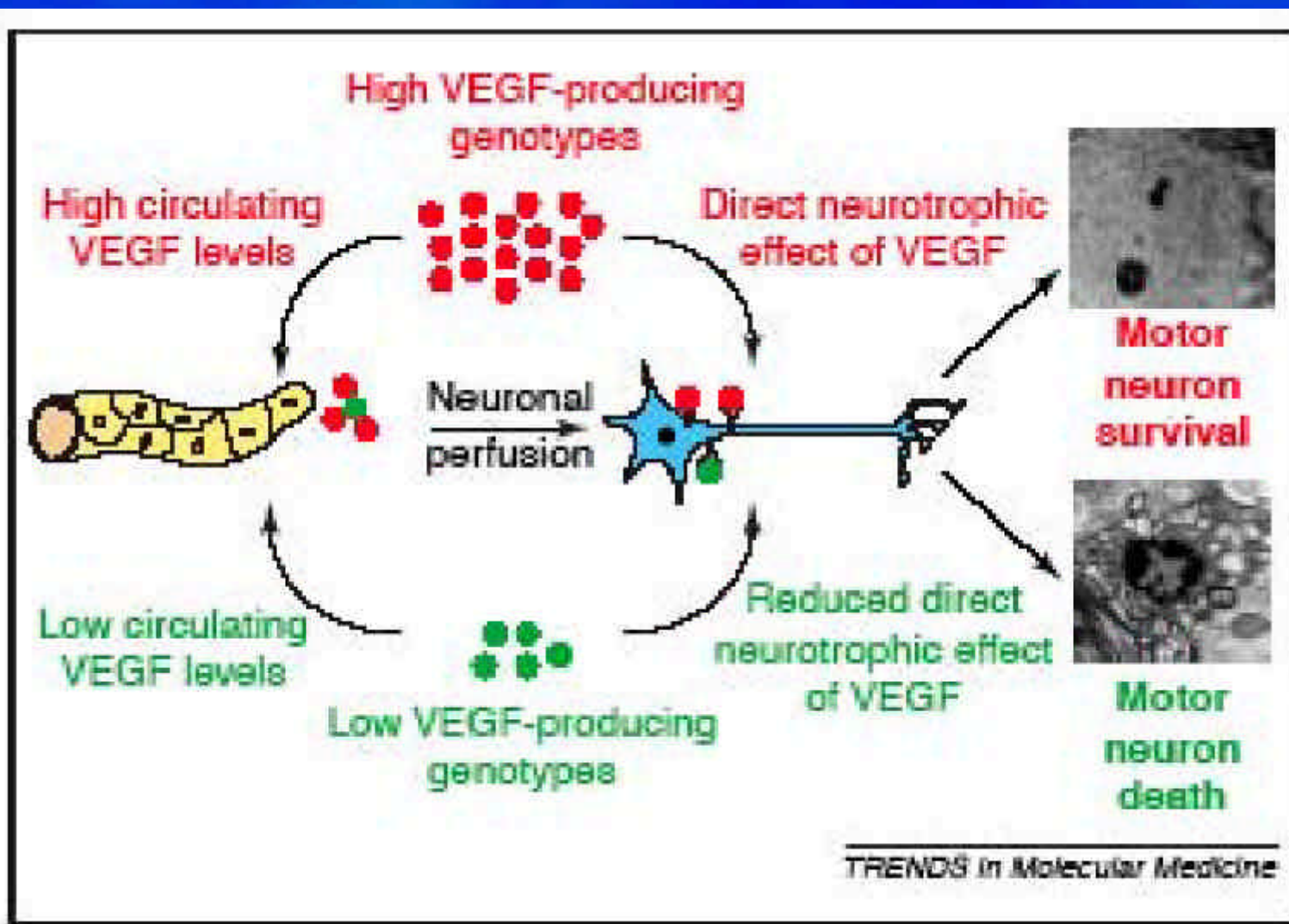
- VEGF-Rezeptor-knockout wirkt embryonal tödlich...
- VEGF nötig zum Motoneuron-Überleben
  - Ooshuise et al 2001 Nature Genet. 28, 131-138
  - Entferntes „Hypoxia-response-Element“ (HRE) vom VEGF Promoter
    - ⇒ ALS ähnlicher Phenotyp mit 30% Reduktion des VEGF-Niveaus im Rückenmark
- CBP Co-Aktivator des „Hypoxie-induzierbaren Faktor-1“ (HIF-1), der den Wachstumsfaktor reguliert
- Test der Hypothese polyQ-AR interferiert mit CBP Aktion auf HIF-1 und VEGF Niveau im Rückenmark



# VEGF 164 Spiegel verändert sich in YAC SBMA TG Mäusen

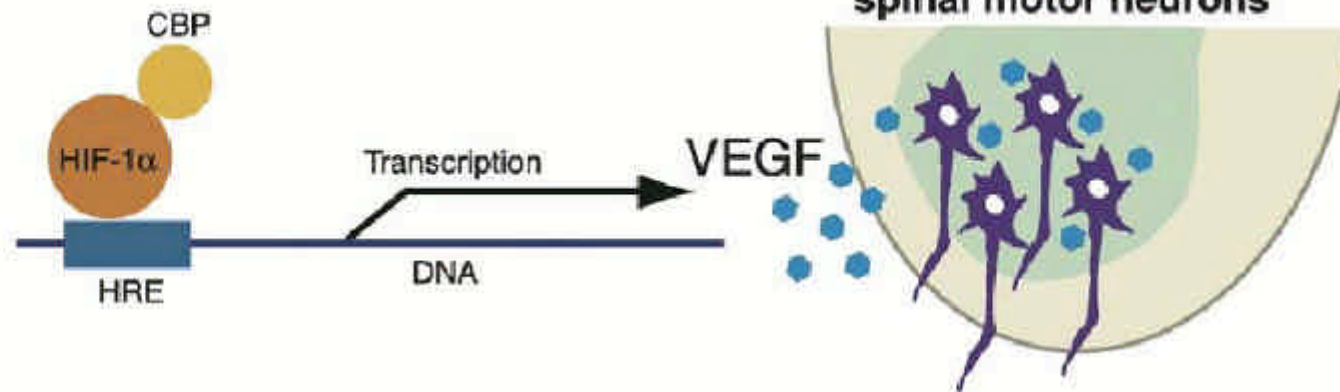


## Einfluss des VEGF 164 Spiegels auf Motoneuronen

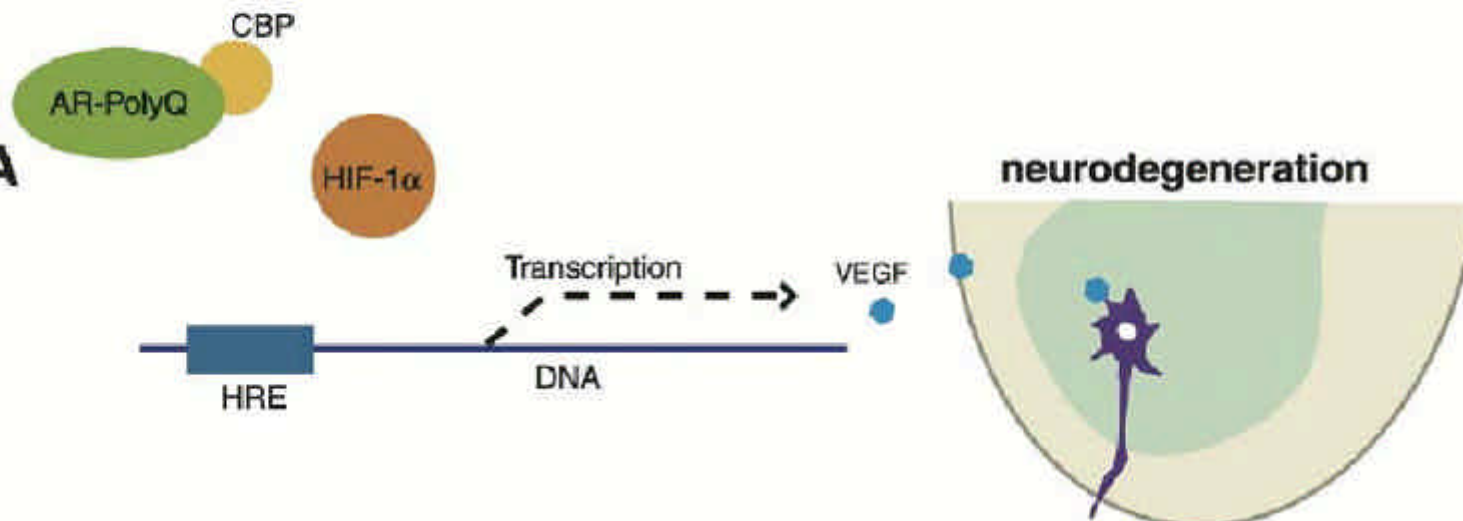


## SBMA - Transkriptionale Fehlregulierung

**Normal**



**SBMA**





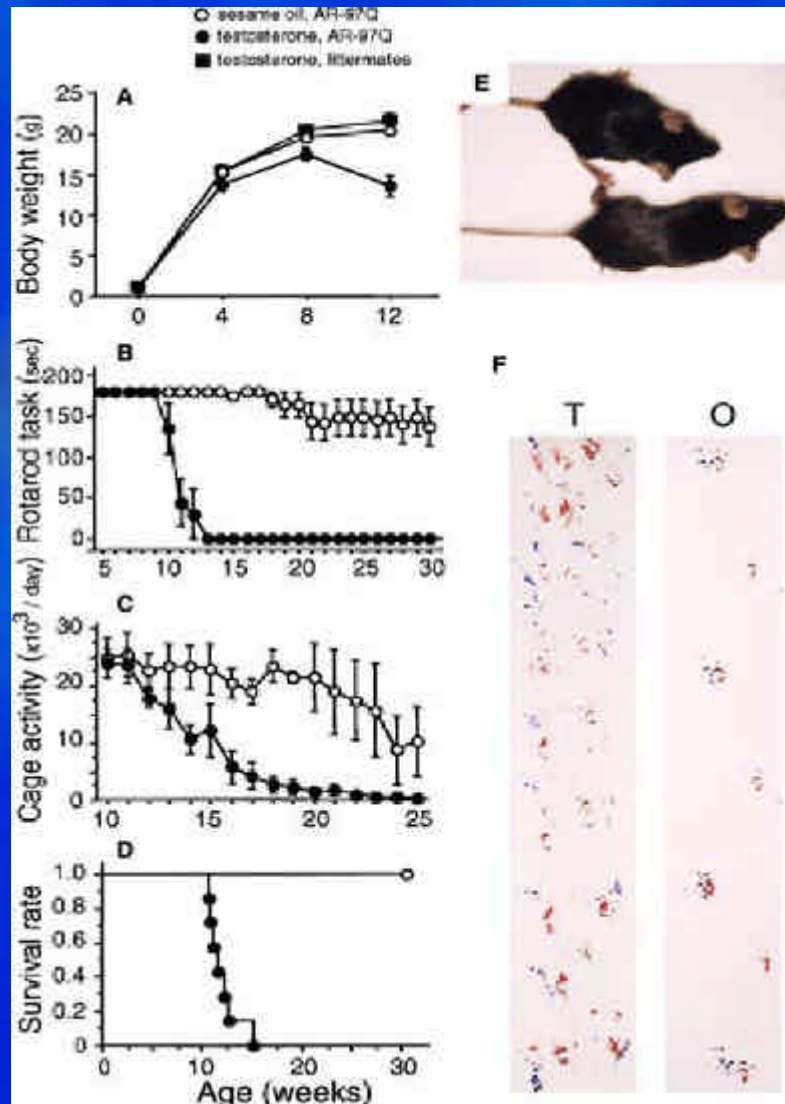
## Role of VEGF in Neuroprotection-Motor Neurons

- Beseitigung des HRE (hypoxia-response element) vom VEGF Promoter erzeugt ALS-ähnliche Syndrome.
- Kreuzung dieser Mäuse mit fALS Mäusen SOD1G93A forciert Phänotyp.
- Variationen in der menschlichen VEGF Promoter/Leader Sequenz, die assoziiert ist mit verringertem Niveau an zirkulierendem VEGF, übertragen auch ein erhöhtes Risiko von ALS.
- VEGF verringert Glutamat-Übererregungsgiftigkeit und die Produktion freier Radikale.
- VEGF-Verbindung zu Motoneuronerkrankungen im Allgemeinen liefert Aussichten auf neue mechanistische Einblicke und Behandlungen von Motoneuronerkrankungen.
- Funktionsmechanismus unbekannt... trophische (gewebsernährende) Unterstützung von Motoneuronen?



- **Kennedy Syndrom – Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA)**
- **Mausmodelle der SBMA**
- **Transkriptionale Regulationsstörung - Motoneuronverlust**
- **Rolle des Testosterons bei SMBA**
- **Eiweißabbau und transkriptionale Regulationsstörung**

## Kastration bewahrt vor dem Kennedy Syndrom



- Gen Sobue Neuron 35, 843-854, 2002.
- Leuprorelin
- Hormon, das Freisetzung des Luteinisierenden Hormons verhindert = (LH-RH)-Agonist\*
- verringert Androgen-Niveaus in den Hoden
- Medikamentöse Kastration
- Verhindert nukleare Translokation des AR

\* RH = releasing hormone  
 LH ist für Testosteronbildung erforderlich  
 LH-RH-Agonist verhindert dies

- **Kennedy Syndrom – Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA)**
- **Mausmodelle der SBMA**
- **Transkriptionale Regulationsstörung - Motoneuronverlust**
- **Rolle des Testosterons bei SMBA**
- **Eiweißabbau und transkriptionale Regulationsstörung**

Welche Rolle spielt  
Testosteron bei SBMA?

Hypothese:

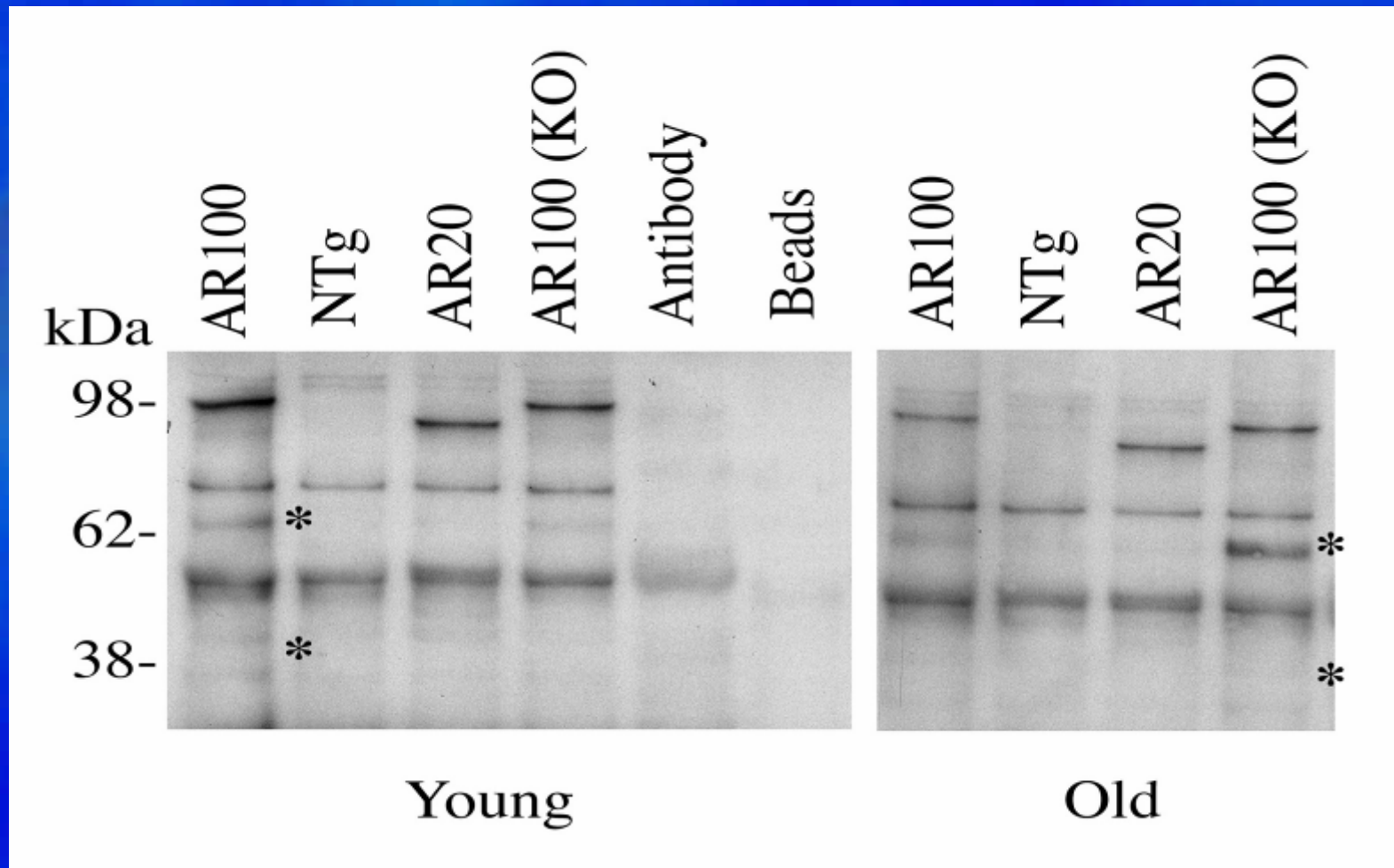
Androgenrezeptor-Fragmente  
nötig für transkriptionale  
Fehlsteuerung



## Beweis für die Rolle der Eiweißspaltung in YAC100

- Verstümmelte Fragment gefunden im obduzierten SMBA-Gewebe.
- Generation vom transgenen Modellen unter Verwendung von endogenem menschlichen AR
- Promoter und erstes Exon des AR – schneller Krankheitsverlauf. AR Modelle mit voller Länge: langsamer Verlauf.
- Caspasen spalten Androgenezeptor. **Spaltung?**
- Gleichartige Wirkung bei allen polyQ-Erkrankungen.
- Testosteron verursacht einen polyQ-abhängigen Anstieg der Eiweißspaltung.

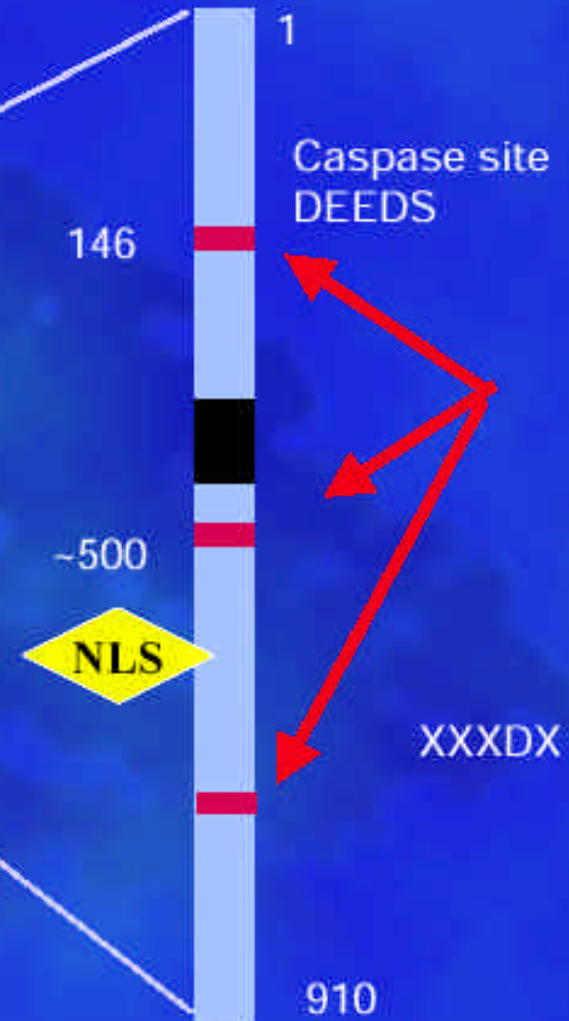
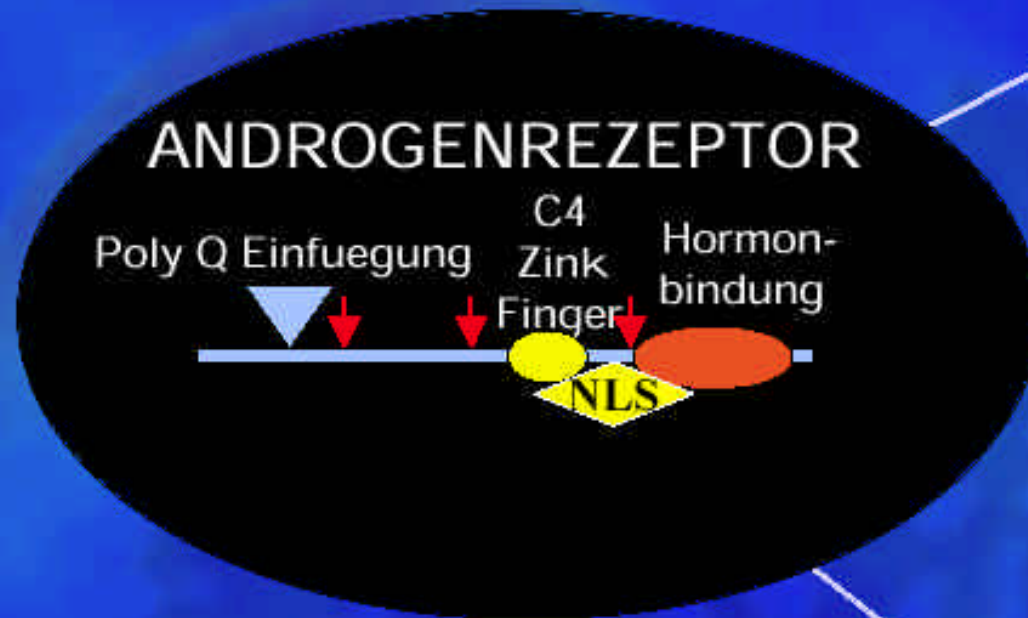
# Beweis für die Rolle der Eiweißspaltung in YAC100



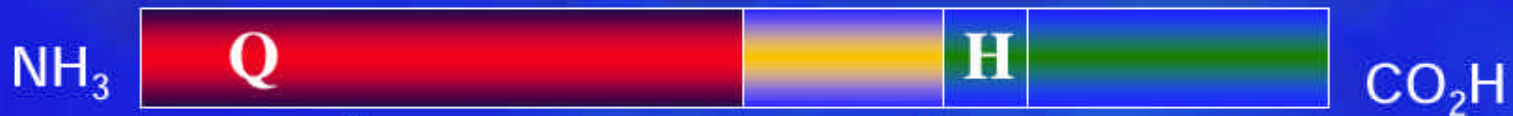
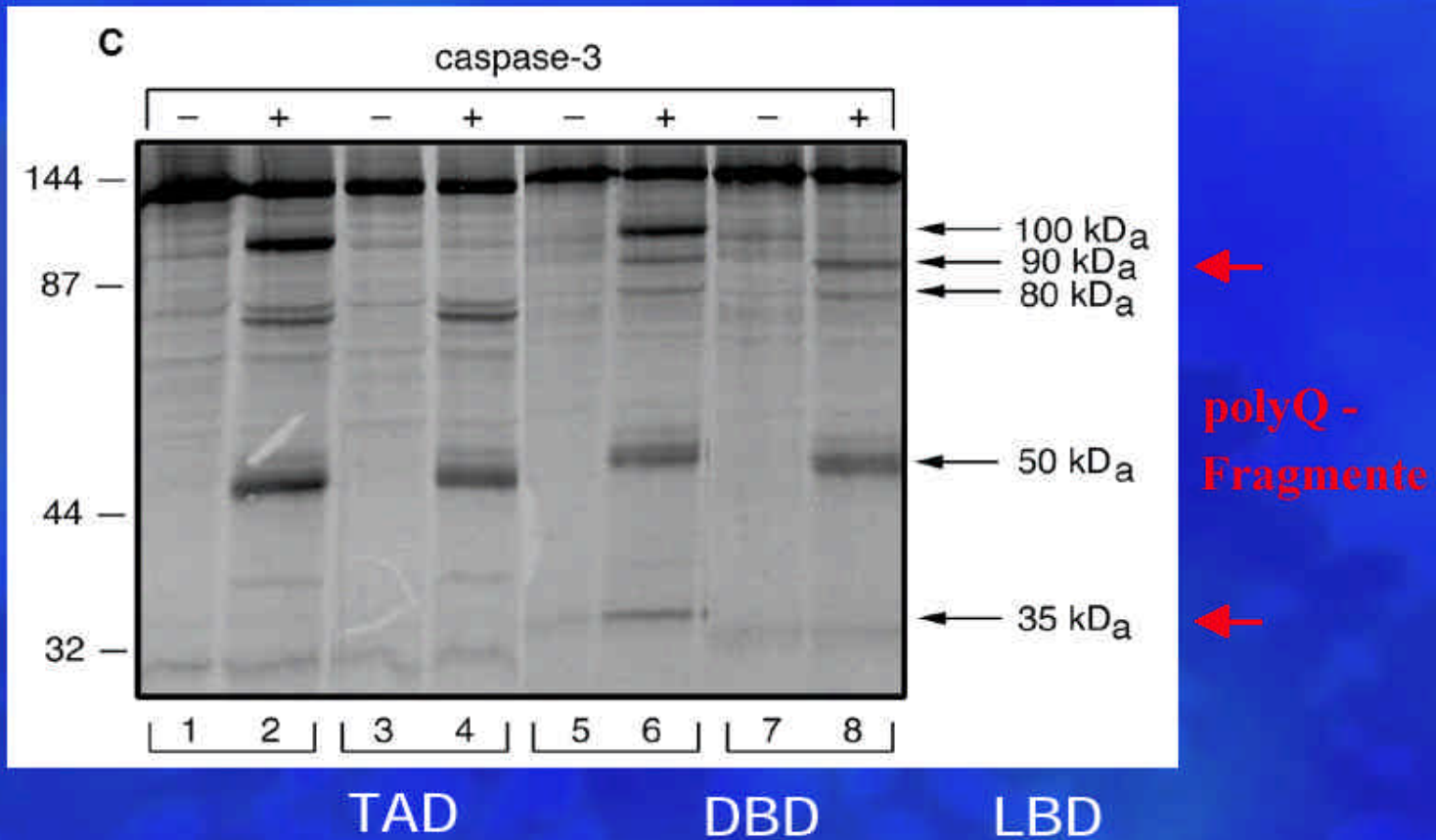
\*Polyglutamin-abhängige N-Terminal\*\* Fragmente

\*\*am Aminoende einer Peptidkette

# Eiweißabbau des Androgenrezeptors

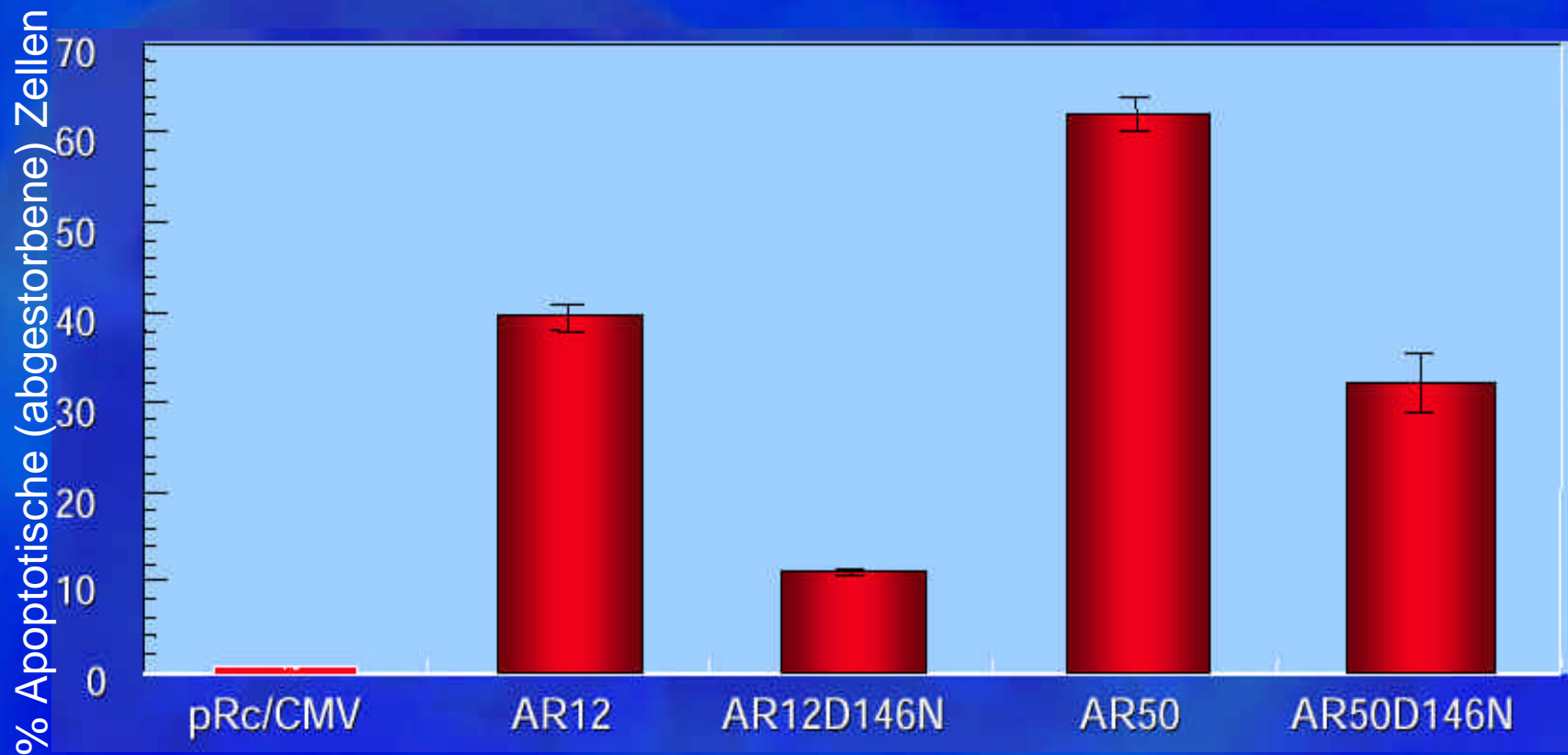


# Androgenrezeptor wird durch Caspasen\* gespalten



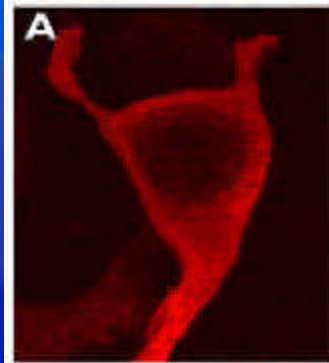
\* Siehe Fachbegriffe

## Caspase-resistente AR verringert Zellgiftigkeit



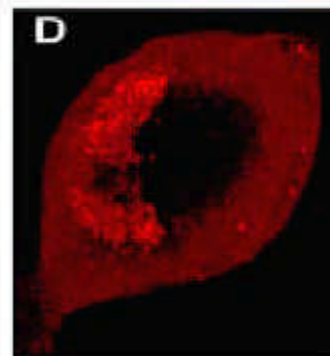
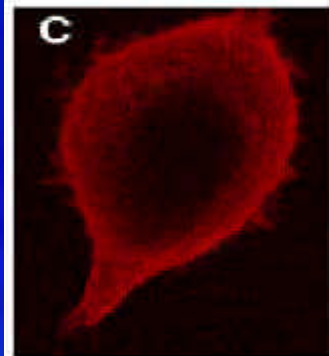


AR12



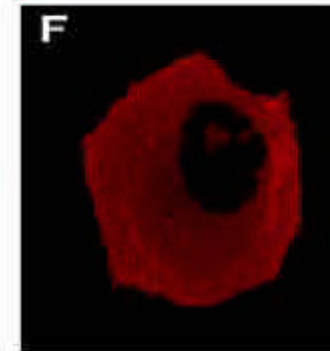
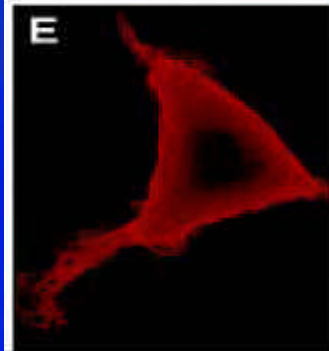
AR12  
+TAM

AR50

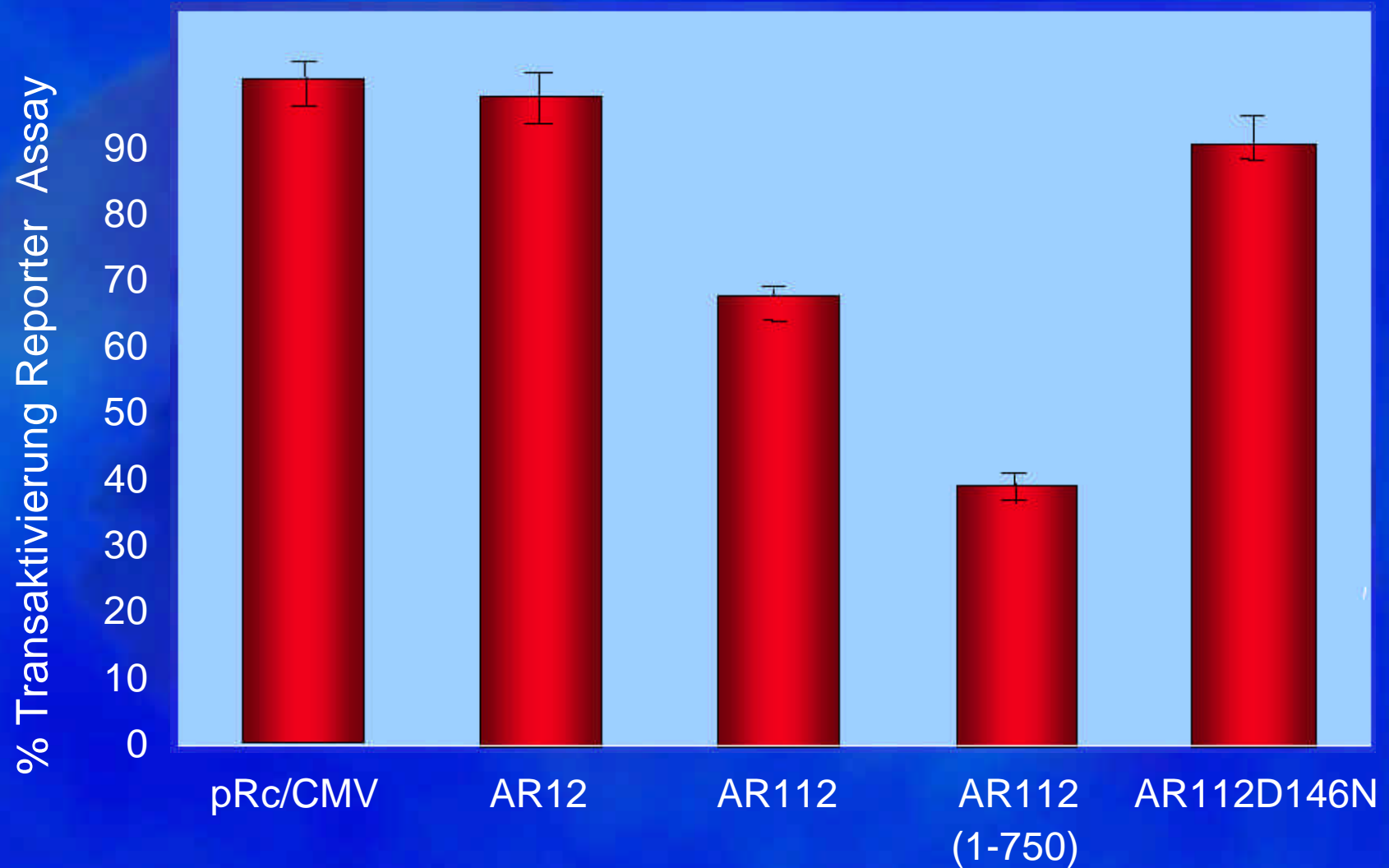


AR50  
+TAM

AR12 D146N  
+TAM



AR50 D146N  
+TAM



## Generation von transgenen SBMA-Mausmodellen



AR12



AR112

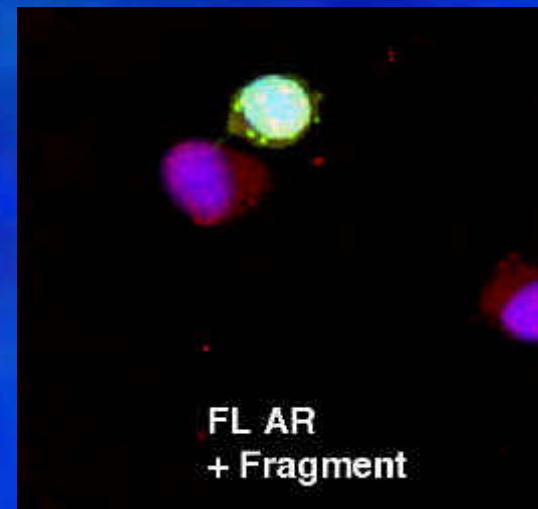
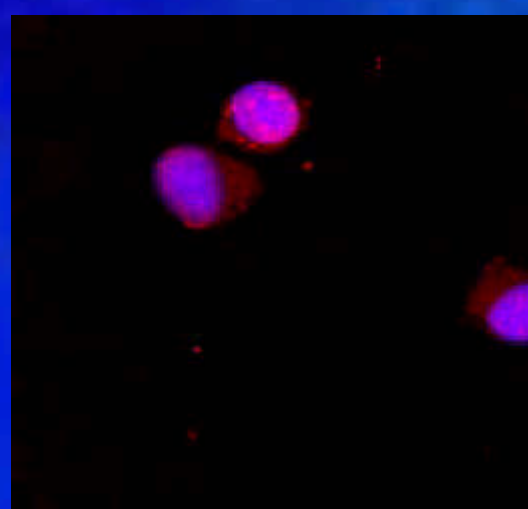
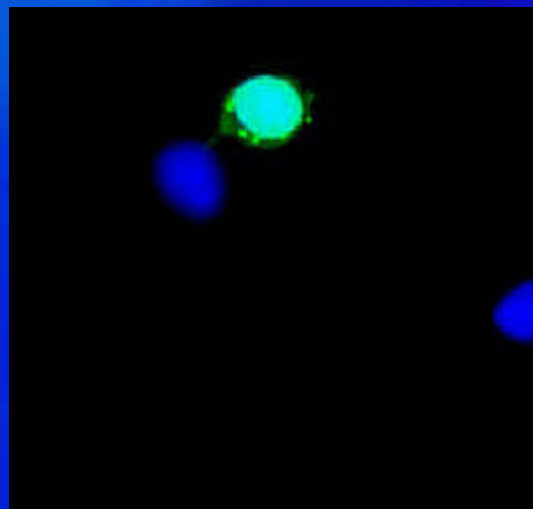
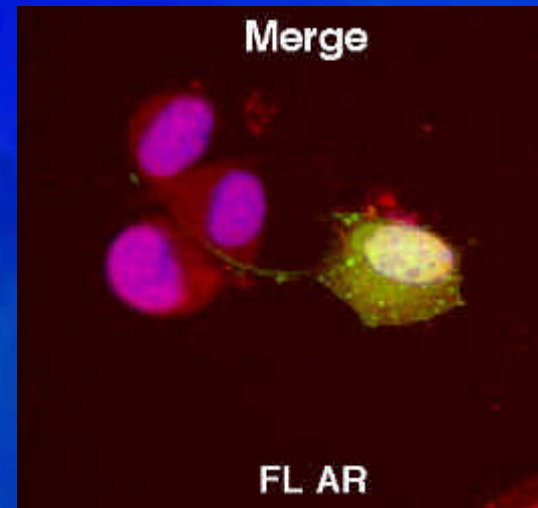
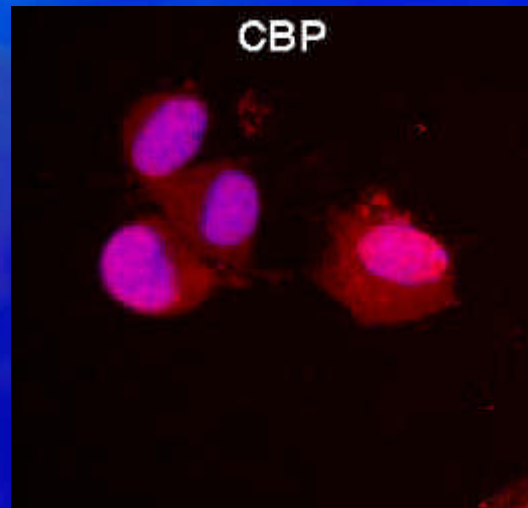
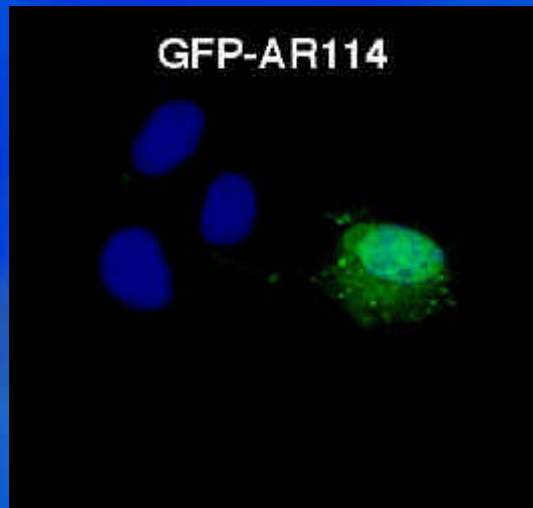


AR112 D146N



CBP, p53, Caspase  
bilden Komplexe  
⇒ Fehlsteuerung

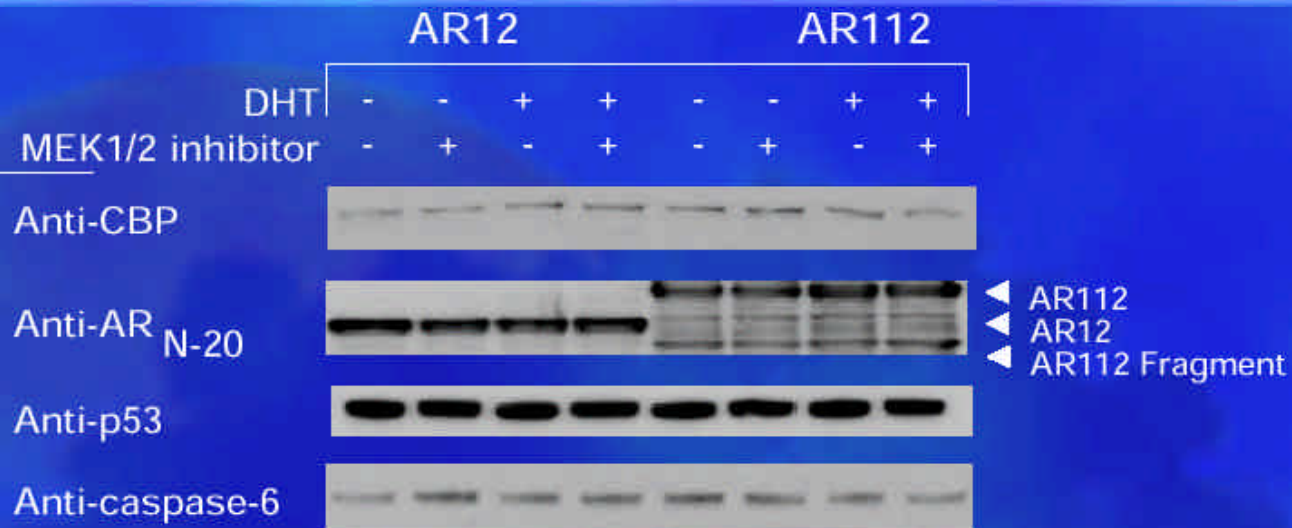
# PolyQ-Erweiterung in AR verändert Lokalisierung von CBP





# FL AR Komplex mit CBP, p53 und CASPASE-6

Input



IP:CBP



- 1) **SBMA ist eine Motoneuron-Krankheit**
  - **Testosteron spielt eine kritische Rolle in der Krankheitsgeschichte und Progression**
- 2) **SBMA Behandlung**
  - **Androgen-blockierende Medikamente werden in der Behandlung von Prostatakrebs eingesetzt**
  - **VEGF (“growth factors”), sind für das Überleben der Motoneuronen unerlässlich**
  - **Protease-Hemmer blockieren die Produktion giftiger Fragmente**
- 3) **Das VEGF Niveau spielt eine wichtige Rolle in Motoneuron-Krankheiten wie fALS und SBMA**



# Das Ellerby Laboratorium

## Postdoktorale Kollegen:

Dr. Juliette Gafni

Dr. Michelle LaFevre-Bernt

## Wissenschaftliche Mitarbeiter:

Cameron Torcassi

Jessica Young

## Gast-Wissenschaftler:

Dr. Evan Hermel

## Morphologie:

Anna Loginova

## Förderung:

NIH

HDF

MDA

HDSA

## Zusammenarbeit mit:

University of Washington

Dr. Al La Spada

Dr. Bryce Sopher